

No English title available.Patent Number: FR2770854

Publication date: 1999-05-14

Inventor(s): BOUDEC PHILIPPE;; BOURDON HELENE;; DUMAS FLORENCE;; SAILLAND ALAIN

Applicant(s): RHONE POULENC AGROCHIMIE (FR)

Requested Patent: WO9924586

Application Number: FR19970014264 19971107

Priority Number (s): FR19970014264 19971107

IPC Classification: C12N15/53; C12N15/82; C12N9/02; C12N5/10; A01H5/00

EC Classification: C12N9/02K, C12N15/82C8B4Equivalents: AU1160399, AU1161499, AU738279, AU749323, CA2309318, CA2309322, EP1029059 (WO9924585), EP1029060 (WO9924586), JP2001522608T, WO9924585, ZA9810076**DOCUMENT # 26**

Abstract

The invention concerns a chimeric hydroxy-phenyl pyruvate dioxygenase (HPPD), comprising the N-terminal part of a first HPPD associated with the C-terminal part of a second HPPD, a nucleic acid sequence coding for said chimera HPPD, a chimeric gene containing said sequence as coding sequence and its use for obtaining plants resistant to certain herbicides.

Data supplied from the **esp@cenet** database - I2

See also document # 26

PCT

ORGANISATION MONDIALE DE LA PROPRIETE INTELLECTUELLE
Bureau international



DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIEE EN VERTU DU TRAITE DE COOPERATION EN MATIERE DE BREVETS (PCT)

(51) Classification internationale des brevets ⁶ : C12N 15/53, 15/62, 15/82, 5/10, 9/02, A01H 5/00, 5/10		A1	(11) Numéro de publication internationale: WO 99/24586 (43) Date de publication internationale: 20 mai 1999 (20.05.99)
(21) Numéro de la demande internationale: PCT/FR98/02391 (22) Date de dépôt international: 9 novembre 1998 (09.11.98)		(81) Etats désignés: AL, AU, BA, BB, BG, BR, CA, CN, CU, CZ, EE, GE, HR, HU, ID, IL, IS, JP, KP, KR, LK, LR, LT, LV, MG, MK, MN, MX, NO, NZ, PL, RO, SG, SI, SK, SL, TR, TT, UA, US, UZ, VN, YU, brevet ARIPO (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SZ, UG, ZW), brevet eurasien (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), brevet européen (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), brevet OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).	
(30) Données relatives à la priorité: 97/14264 7 novembre 1997 (07.11.97) FR		Publiée <i>Avec rapport de recherche internationale. Avant l'expiration du délai prévu pour la modification des revendications, sera republiée si des modifications sont reçues.</i>	
(71) Déposant (pour tous les Etats désignés sauf US): RHONE-POULENC AGRO [FR/FR]; 14-20, rue Pierre Baizet, F-69009 Lyon (FR).		(72) Inventeurs; et (75) Inventeurs/Déposants (US seulement): BOUDEC, Philippe [FR/FR]; 7, rue Camille de Neuville, F-69009 Lyon (FR). BOURDON, Hélène [FR/FR]; 8, allée des Tullistes, F-69130 Ecully (FR). DUMAS, Florence [FR/FR]; 3, rue de la Pécherie, F-69250 Fleurieu sur Saône (FR). RODGERS, Matthew [GB/GB]; Rhône-Poulenc Agriculture Ltd., Fyfield Road, Ongar, Essex CMS OHW (GB). SAILLAND, Alain [FR/FR]; 38, rue Albert Chalinel, F-69009 Lyon (FR).	
(74) Mandataire: TETAZ, Franck; Rhône-Poulenc Agro, Boîte postale 9163, F-69263 Lyon Cedex 09 (FR).			

(54) Title: CHIMERIC HYDROXY-PHENYL PYRUVATE DIOXYGENASE, DNA SEQUENCE AND METHOD FOR OBTAINING PLANTS CONTAINING SUCH A GENE, WITH HERBICIDE TOLERANCE

(54) Titre: HYDROXY-PHENYL PYRUVATE DIOXYGENASE CHIMERE, SEQUENCE D'ADN ET OBTENTION DE PLANTES CONTENANT UN TEL GENE, TOLERANTES AUX HERBICIDES

(57) Abstract

The invention concerns a chimeric hydroxy-phenyl pyruvate dioxygenase (HPPD), comprising the N-terminal part of a first HPPD associated with the C-terminal part of a second HPPD, a nucleic acid sequence coding for said chimera HPPD, a chimeric gene containing said sequence as coding sequence and its use for obtaining plants resistant to certain herbicides.

(57) Abrégé

La présente invention concerne une hydroxy-phénol pyruvate dioxygénase (HPPD) chimère, comprenant la partie N-terminale d'une première HPPD associée à la partie C-terminale d'une deuxième HPPD, une séquence d'acide nucléique codant pour cette HPPD chimère, un gène chimère contenant cette séquence comme séquence codante et son utilisation pour l'obtention de plantes résistantes à certains herbicides.

UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION

Codes utilisés pour identifier les Etats parties au PCT, sur les pages de couverture des brochures publiant des demandes internationales en vertu du PCT.

AL	Albanie	ES	Espagne	LS	Lesotho	SI	Slovénie
AM	Arménie	FI	Finlande	LT	Lituanie	SK	Slovaquie
AT	Autriche	FR	France	LU	Luxembourg	SN	Sénégal
AU	Australie	GA	Gabon	LV	Lettonie	SZ	Swaziland
AZ	Azerbaïdjan	GB	Royaume-Uni	MC	Monaco	TD	Tchad
BA	Bosnie-Herzégovine	GE	Géorgie	MD	République de Moldova	TG	Togo
BB	Barbade	GH	Ghana	MG	Madagascar	TJ	Tadjikistan
BE	Belgique	GN	Guinée	MK	Ex-République yougoslave de Macédoine	TM	Turkménistan
BF	Burkina Faso	GR	Grèce	ML	Mali	TR	Turquie
BG	Bulgarie	HU	Hongrie	MN	Mongolie	TT	Trinité-et-Tobago
BJ	Bénin	IE	Irlande	MR	Mauritanie	UA	Ukraine
BR	Brésil	IL	Israël	MW	Malawi	UG	Ouganda
BY	Bélarus	IS	Islande	MX	Mexique	US	Etats-Unis d'Amérique
CA	Canada	IT	Italie	NE	Niger	UZ	Ouzbékistan
CF	République centrafricaine	JP	Japon	NL	Pays-Bas	VN	Viet Nam
CG	Congo	KE	Kenya	NO	Norvège	YU	Yougoslavie
CH	Suisse	KG	Kirghizistan	NZ	Nouvelle-Zélande	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	République populaire démocratique de Corée	PL	Pologne		
CM	Cameroun	KR	République de Corée	PT	Portugal		
CN	Chine	KZ	Kazakhstan	RO	Roumanie		
CU	Cuba	LC	Sainte-Lucie	RU	Fédération de Russie		
CZ	République tchèque	LI	Liechtenstein	SD	Soudan		
DE	Allemagne	LK	Sri Lanka	SE	Suède		
DK	Danemark	LR	Libéria	SG	Singapour		

Hydroxy-phényl pyruvate dioxygénase chimère, séquence d'ADN et obtention de plantes contenant un tel gène, tolérantes aux herbicides.

5 La présente invention concerne une séquence d'acide nucléique codant pour une hydroxy-phényl pyruvate dioxygénase (HPPD) chimère, un gène chimère contenant cette séquence comme séquence codante et son utilisation pour l'obtention de plantes résistantes à certains herbicides.

10 Les hydroxy-phényl pyruvate dioxygénases sont des enzymes qui catalysent la réaction de transformation du para-hydroxy-phényl-pyruvate (HPP) en homogentisate. Cette réaction a lieu en présence de fer (Fe^{2+}) en présence d'oxygène (Crouch N.P. & al., Tetrahedron, 53, 20, 6993-7010, 1997). On peut émettre l'hypothèse que les HPPD contiennent un site actif apte à catalyser cette réaction dans lequel viennent se lier le fer, le substrat et la molécule d'eau, un tel site actif n'ayant jamais été décrit à ce jour.

15 On connaît par ailleurs certaines molécules inhibitrices de cette enzyme, qui viennent se fixer à l'enzyme de manière compétitive pour inhiber la transformation de l'HPP en homogentisate. Certaines de ces molécules ont trouvé un emploi comme herbicides, dans la mesure où l'inhibition de la réaction dans les plantes conduit à un blanchiment des feuilles des plantes traitées, et à la mort des dites plantes (Pallett K. E. et 20 al. 1997 Pestic. Sci. 50 83-84). De tels herbicides ayant pour cible l'HPPD décrits dans l'état de la technique sont notamment les isoxazoles (EP 418 175, EP 470 856, EP 487 352, EP 527 036, EP 560 482, EP 682 659, US 5 424 276) en particulier l'isoxaflutole, herbicide sélectif du maïs, les dicétonitriles (EP 496 630, EP 496 631), en particulier la 2-cyano-3-cyclopropyl-1-(2-SO₂ CH₃-4-CF₃ phényl) propane-1,3-dione et la 2-cyano-3-cyclopropyl- 25 1-(2-SO₂ CH₃-4-2,3 Cl₂ phényl) propane-1, 3-dione, les tricétones (EP 625 505, EP 625 508, US 5,506,195), en particulier la sulcotrione ou encore les pyrazolinates.

30 Pour rendre les plantes tolérantes aux herbicides, on dispose de trois stratégies principales, (1) la détoxification de l'herbicide par une enzyme venant transformer l'herbicide, ou son métabolite actif, en produits de dégradation non toxique, comme par exemple les enzymes de tolérance au bromoxynil ou au basta (EP 242 236, EP 337 899) ; (2) la mutation de l'enzyme cible en une enzyme fonctionnelle moins sensible à l'herbicide, ou son métabolite actif, comme par exemple les enzymes de tolérance au

glyphosate (EP 293 356, Padgett S. R. & al., J. Biol. Chem., 266, 33, 1991) ; ou (3) la surexpression de l'enzyme sensible, de manière à produire dans la plante des quantités suffisantes d'enzyme cible au regard des constantes cinétiques de cette enzyme vis à vis de l'herbicide de manière à avoir suffisamment d'enzyme fonctionnelle, malgré la présence de 5 son inhibiteur.

C'est cette troisième stratégie qui a été décrite pour obtenir avec succès des plantes tolérantes aux inhibiteurs d'HPPD (WO 96/38567), étant entendu que pour la première fois une stratégie de simple surexpression de l'enzyme cible sensible (non mutée) était employée avec succès pour conférer aux plantes une tolérance à un niveau agronomique à 10 un herbicide.

Malgré le succès obtenu avec cette stratégie de simple surexpression de l'enzyme cible, il reste nécessaire de diversifier le système de tolérance aux inhibiteurs d'HPPD, pour obtenir une tolérance quelques soient les conditions de culture des plantes tolérantes ou les doses commerciales d'application des herbicides dans les champs. On connaît de 15 l'état de la technique (WO 96/38567) que des enzymes d'origine différente (plantes, bactéries, champignons) ont des séquences protéiques primaires substantiellement différentes, alors que ces enzymes ont une fonction identique et des caractéristiques cinétiques essentiellement similaires ou voisines.

On a maintenant constaté que toutes ces HPPD ont d'une part un grand nombre 20 d'homologies de séquence dans leur partie C-terminale (figure 1), et d'autre part une structure tertiaire (tridimensionnelle) essentiellement similaire (figure 2). Au regard du caractère compétitif de l'inhibition, on émet l'hypothèse que les inhibiteurs d'HPPD viennent se lier à l'enzyme dans le site actif de cette dernière, ou à proximité de celui-ci, de manière à bloquer l'accès de l'HPP à ce site actif et empêcher sa transformation en 25 présence de fer et d'eau. On a maintenant constaté qu'en effectuant une mutation de l'enzyme dans sa partie C-terminale, il était possible d'obtenir des HPPD fonctionnelles moins sensibles aux inhibiteurs d'HPPD, de manière que leur expression dans les plantes permette une tolérance améliorée aux inhibiteurs d'HPPD. Au regard de ces éléments, on peut donc conclure que le site actif de l'enzyme est localisé dans sa partie C-terminale, sa 30 partie N-terminale assurant essentiellement sa stabilité et son oligomérisation (l'HPPD de *Pseudomonas* est un tétramère, celles de plantes sont des dimères).

On a maintenant constaté qu'il était possible de réaliser une enzyme chimère en associant la partie N-terminale d'une première enzyme la partie C-terminale d'une seconde enzyme, pour obtenir une nouvelle HPPD chimère fonctionnelle, permettant de choisir chaque partie pour des propriétés particulières, comme par exemple choisir la partie N-5 terminale d'une première enzyme pour ses propriétés de stabilité dans une cellule donnée (végétale, bactérienne, etc.) et la partie C-terminale d'une deuxième enzyme pour ses propriétés cinétiques (activité, tolérance aux inhibiteurs, etc.).

La présente invention concerne donc en premier lieu une HPPD chimère, qui tout en étant fonctionnelle, c'est à dire conservant ses propriétés de catalyse de la 10 transformation de l'HPP en homogentisate, comprend la partie N-terminale d'une première HPPD associée à la partie C-terminale d'une deuxième HPPD.

Chaque partie de l'HPPD chimère selon l'invention provient d'une HPPD pouvant être de toute origine, notamment choisies parmi les HPPD de plantes, de bactéries ou de champignons.

15 Selon un mode préférentiel de réalisation de l'invention, la partie N-terminale de l'HPPD chimère provient d'une HPPD de plante, ladite plante étant préférentiellement choisie parmi les plantes dicotylédones, notamment *Arabidopsis thaliana* ou *Daucus carotta*, ou encore de monocotylédones comme le maïs ou le blé.

20 Selon un autre mode préférentiel de réalisation de l'invention, la partie C-terminale de l'HPPD chimère provient d'une HPPD de plante, telle que définie ci-dessus, ou d'une HPPD de micro-organisme, notamment une bactérie, en particulier *Pseudomonas*, plus particulièrement *Pseudomonas fluorescens*, ou de champignon, cette partie C-terminale pouvant être naturelle ou mutée par la substitution de un ou plusieurs acides aminés de la 25 partie C-terminale de l'HPPD d'origine, notamment pour la rendre moins sensible aux inhibiteurs d'HPPD.

Plusieurs HPPD et leur séquence primaire ont été décrites dans l'état de la technique, notamment les HPPD de bactéries comme *Pseudomonas* (Rüetschi & al., Eur. J. Biochem., 205, 459-466, 1992, WO 96/38567), de plantes comme d'*Arabidopsis* (WO 96/38567, Genebank AF047834) ou de carotte (WO 96/38567, Genebank 87257), de 30 *Coccicoides* (Genebank COITRP), ou de mammifères comme la souris ou le cochon.

L'alignement de ces séquences connues, par les moyens usuels de la technique, comme par exemple la méthode décrite par Thompson, J.D. & al. (CLUSTAL W:

improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, positions-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research*, 22:4673-4680, 1994), et l'accès à ces programmes informatique d'alignement de séquence accessibles par exemple via internet, l'homme du métier peut définir les 5 homologies de séquence par rapport à une séquence de référence, et retrouver les acides aminés clés, ou encore définir des régions communes, notamment permettant de définir une région C-terminale et une région N-terminale à partir de cette séquence de référence.

Pour la présente invention, la séquence de référence est la séquence de *Pseudomonas*, toutes les définitions et indications de positions d'acides aminés particuliers 10 étant faites par rapport à la séquence primaire d'HPPD de *Pseudomonas*. La figure 1 en annexe représente un alignement de plusieurs séquences d'HPPD décrites dans l'état de la technique, alignées par rapport à la séquence d'HPPD de *Pseudomonas* comme référence, comprenant les séquence d'HPPD de *Streptomyces avermitilis* (Genebank SAV11864), de *Daucus carota* (Genebank DCU 87257), d'*Arabidopsis thaliana* (Genebank AF047834), 15 de *Zea mais*, de *Hordeum vulgare* (Genebank HVAJ693), de *Mycosphaerella graminicola* (Genebank AF038152), de *Coccicoides immitis* (Genebank COITRP) et de *Mus musculus* (Genebank MU54HD). La numérotation des acides aminés de la séquence de *Pseudomonas* est donnée sur cette figure, de même que les acides aminés communs à ces séquences, 20 désignés par une astérisque. Sur la base d'un tel alignement il est aisément d'identifier à partir de la définition de l'acide aminé de *Pseudomonas* par sa position et sa nature, la position de l'acide aminé correspondant dans une autre séquence d'HPPD (l'alignement de séquences de différentes origines, plantes, mammifères, bactéries, montrant que cette méthode d'alignement bien connue de l'homme du métier peut être généralisée à toute autre séquence). Un alignement de différentes séquences d'HPPD est également décrit dans 25 la demande de brevet WO 97/49816.

La partie C-terminale des HPPD, siège du site actif de l'enzyme, se distingue par un peptide de liaison de sa partie N-terminale comme le montre la représentation schématique de la structure ternaire du monomère de l'HPPD de *Pseudomonas* représentée en figure 2. Cette structure a été obtenue par les méthodes usuelles d'étude de la diffraction aux rayons 30 X de cristaux. Le peptide de liaison va permettre de définir l'extrémité N-terminale de la partie C-terminale de l'enzyme, ledit peptide se situant entre les acides aminés 145 et 157 pour *Pseudomonas* (c.f. figure 1).

La partie C-terminale peut donc être définie comme constituée par la séquence définie d'une part par le peptide de liaison, et d'autre part par l'extrémité C-terminale de l'enzyme. Sur l'alignement de séquences représenté sur la figure 1 en annexe, on remarque pour toutes les séquences deux acides aminés en position 161 et 162 pour la séquence de 5 *Pseudomonas*, (D = Asp161 et H = His162). Par référence à l'HPPD de *Pseudomonas*, on peut donc définir que le peptide de liaison représentant l'extrémité N-terminale de la partie C-terminale de l'HPPD se situe entre environ 5 et 15 acides aminés en amont de l'acide aminé Asp161.

La présente invention concerne également une séquence d'acide nucléique codant 10 pour une HPPD chimère décrite ci-dessus. Selon la présente invention, on entend par " séquence d'acide nucléique " une séquence nucléotidique pouvant être de type ADN ou ARN, de préférence de type ADN, notamment double brin, qu'elle soit d'origine naturelle ou synthétique, notamment une séquence d'ADN pour laquelle les codons codant pour l'HPPD chimère selon l'invention auront été optimisés en fonction de l'organisme hôte 15 dans lequel elle sera exprimée, ces méthodes d'optimisations étant bien connues de l'homme du métier.

Les séquences codant pour chaque HPPD d'origine de l'HPPD chimère selon 20 l'invention, peuvent être d'origine quelconque. En particulier elle peut être d'origine bactérienne. Comme exemples particuliers on peut citer des bactéries du type *Pseudomonas sp*, par exemple *Pseudomonas fluorescens* ou encore des cyanobactéries du type *Synechocystis*. La séquence peut être aussi d'origine végétale, notamment issu de plantes dicotylédones telles que tabac, *Arabidopsis*, d'ombellifères telles que *Daucus carota* ou encore monocotylédones telles que le *Zea mays* ou le blé. Les séquences codantes et le moyen de les isoler et cloner sont décrits dans les références citées 25 auparavant, dont le contenu est incorporé ici par référence.

Les séquences codantes des parties N-terminales et C-terminales de l'HPPD chimère selon l'invention peuvent être assemblées par toute méthode usuelle de construction et d'assemblage de fragments d'acides nucléiques bien connues de l'homme du métier et largement décrites dans la littérature, illustrées notamment par les exemples de 30 réalisation de l'invention.

La présente invention concerne donc également un procédé de préparation d'une séquence d'acide nucléique codant pour une HPPD chimère selon l'invention, ledit procédé étant défini ci-dessus.

L'invention a encore pour objet l'utilisation d'une séquence d'acide nucléique 5 codant pour une HPPD chimère selon l'invention dans un procédé pour la transformation des plantes, comme gène marqueur ou comme séquence codante permettant de conférer à la plante une tolérance aux herbicides inhibiteurs d'HPPD. Cette séquence peut bien entendu également être utilisée en association avec d'autre(s) gène(s) marqueur(s) et/ou séquence(s) codante(s) pour une ou plusieurs propriétés agronomiques.

10 La présente invention concerne également un gène chimère (ou cassette d'expression) comprenant une séquence codante ainsi que des éléments de régulation en position 5' et 3' hétérologues pouvant fonctionner dans un organisme hôte, en particulier les cellules végétales ou les plantes, la séquence codante comprenant au moins une séquence d'acide nucléique codant pour une HPPD chimère telle que définie précédemment.

15 Par organisme hôte, on entend tout organisme mono ou pluricellulaire, inférieur ou supérieur, dans lequel le gène chimère selon l'invention peut être introduit, pour la production d'HPPD chimère. Il s'agit en particulier de bactéries, par exemple *E. coli*, de levures, en particulier des genres *Saccharomyces* ou *Kluyveromyces*, *Pichia*, de champignons, en particulier *Aspergillus*, d'un bacilovirus, ou de préférence des cellules 20 végétales et des plantes.

Par "cellule végétale", on entend selon l'invention toute cellule issue d'une plante et pouvant constituer des tissus indifférenciés tels que des cals, des tissus différenciés tels que des embryons, des parties de plantes, des plantes ou des semences.

On entend par "plante" selon l'invention, tout organisme multicellulaire différencié 25 capable de photosynthèse, en particulier monocotylédones ou dicotylédones, plus particulièrement des plantes de culture destinées ou non à l'alimentation animale ou humaine, comme le maïs, le blé, le colza, le soja, le riz, la canne à sucre, la betterave, le tabac, le coton, etc.

Les éléments de régulation nécessaires à l'expression de la séquence d'acide 30 nucléique codant pour une HPPD sont bien connus de l'homme du métier en fonction de l'organisme hôte. Ils comprennent notamment des séquences promotrices, des activateurs de transcription, des séquences terminatrices, y compris des codons start et stop. Les

moyens et méthodes pour identifier et sélectionner les éléments de régulation sont bien connus de l'homme du métier et largement décrits dans la littérature.

L'invention concerne plus particulièrement la transformation des plantes. Comme séquence de régulation promotrice dans les plantes, on peut utiliser toute séquence promotrice d'un gène s'exprimant naturellement dans les plantes en particulier un promoteur s'exprimant notamment dans les feuilles des plantes, comme par exemple des promoteurs dits constitutifs d'origine bactérienne, virale ou végétale tel que, par exemple un promoteur d'histone tel que décrit dans la demande EP 0 507 698, ou un promoteur d'actine de riz., d'un gène de virus de plante tel que, par exemple, celui de la mosaïque du choux fleur (CAMV 19S ou 35S), ou encore des promoteurs dits lumière dépendants comme celui d'un gène de la petite sous-unité de ribulose-biscarboxylase/oxygénase (RuBisCO) de plante, ou tout promoteur convenable connu pouvant être utilisé.

Selon l'invention, on peut également utiliser, en association avec la séquence de régulation promotrice, d'autres séquences de régulation, qui sont situées entre le promoteur et la séquence codante, telles que des activateurs de transcription ("enhancer"), comme par exemple l'activateur de translation du virus de la mosaïque du tabac (TMV) décrit dans la demande WO 87/07644, ou du virus etch du tabac (TEV) décrit par Carrington & Freed.

Comme séquence de régulation terminatrice ou de polyadénylation, on peut utiliser toute séquence correspondante d'origine bactérienne, comme par exemple le terminateur nos d'*Agrobacterium tumefaciens*, ou encore d'origine végétale, comme par exemple un terminateur d'histone tel que décrit dans la demande EP 0 633 317.

Selon un mode particulier de réalisation de l'invention, on emploie en 5' de la séquence d'acide nucléique codant pour une HPPD chimère, une séquence d'acide nucléique codant pour un peptide de transit, cette séquence étant disposée entre la région promotrice et la séquence codant pour l'HPPD chimère de manière à permettre l'expression d'une protéine de fusion peptide de transit/HPPD chimère, cette dernière étant définie précédemment. Le peptide de transit permet d'adresser l'HPPD chimère dans les plastes, plus particulièrement les chloroplastes, la protéine de fusion étant clivée entre le peptide de transit et l'HPPD chimère au passage de la membrane des plastes. Le peptide de transit peut être simple, comme un peptide de transit d'EPSPS (décrit dans le brevet US 5,188,642) ou un peptide de transit de celui de la petite sous-unité de ribulose-biscarboxylase/oxygénase (ssu RuBisCO) d'une plante, éventuellement comprenant

quelques acides aminés de la partie N-terminale de la ssu RuBisCO mature (EP 189 707) ou encore un peptide de transit multiple comprenant un premier peptide de transit de plante fusionné à une partie de la séquence N-terminale d'une protéine mature à localisation plastidiale, fusionnée à un deuxième peptide de transit de plante tel que décrit dans le 5 brevet EP 508 909, et plus particulièrement le peptide de transit optimisé comprenant un peptide de transit de la ssu RuBisCO de tournesol fusionné à 22 acides aminés de l'extrémité N-terminale de la ssu RuBisCO de maïs fusionnée au peptide de transit de la ssu RuBisCO de maïs tel que décrit avec sa séquence codante dans le brevet EP 508 909.

La présente invention concerne également la protéine de fusion peptide de 10 transit/HPPD chimère, les deux éléments de cette protéine de fusion étant définis plus haut.

La présente invention concerne également un vecteur de clonage et/ou d'expression pour la transformation d'un organisme hôte contenant au moins un gène chimère tel que défini ci-dessus. Ce vecteur comprend outre le gène chimère ci-dessus, au moins une origine de réplication. Ce vecteur peut être constitué par un plasmide, un cosmide, un 15 bactériophage ou un virus, transformés par l'introduction du gène chimère selon l'invention. De tels vecteurs de transformation en fonction de l'organisme hôte à transformer sont bien connus de l'homme du métier et largement décrits dans la littérature. Pour la transformation des cellules végétales ou des plantes, il s'agira notamment d'un virus qui peut être employé pour la transformation des plantes développées et contenant en 20 outre ses propres éléments de réplication et d'expression. De manière préférentielle, le vecteur de transformation des cellules végétales ou des plantes selon l'invention est un plasmide.

L'invention a encore pour objet un procédé de transformation des organismes hôtes, en particulier des cellules végétales par intégration d'au moins une séquence d'acide 25 nucléique ou un gène chimère tels que définis ci-dessus, transformation qui peut être obtenue par tout moyen connu approprié, amplement décrit dans la littérature spécialisée et notamment les références citées dans la présente demande, plus particulièrement par le vecteur selon l'invention.

Une série de méthodes consiste à bombarder des cellules, des protoplastes ou des 30 tissus avec des particules auxquelles sont accrochées les séquences d'ADN. Une autre série de méthodes consiste à utiliser comme moyen de transfert dans la plante un gène chimère inséré dans un plasmide Ti d'*Agrobacterium tumefaciens* ou Ri d'*Agrobacterium*

rhizogenes. D'autres méthodes peuvent être utilisées telles que la micro-injection ou l'électroporation, ou encore la précipitation directe au moyen de PEG. L'homme du métier fera le choix de la méthode appropriée en fonction de la nature de l'organisme hôte, en particulier de la cellule végétale ou de la plante.

5 La présente invention a encore pour objet les organismes hôtes, en particulier cellules végétales ou plantes, transformés et contenant un gène chimère comprenant une séquence codante pour une HPPD chimère définie ci-dessus.

La présente invention a encore pour objet les plantes contenant des cellules transformées, en particulier les plantes régénérées à partir des cellules transformées. La 10 régénération est obtenue par tout procédé approprié qui dépend de la nature de l'espèce, comme par exemple décrit dans les références ci-dessus. Pour les procédés de transformation des cellules végétales et de régénération des plantes, on citera notamment les brevets et demandes de brevet suivants: US 4,459,355, US 4,536,475, US 5,464,763, US 5,177,010, US 5,187,073, EP 267,159, EP 604 662, EP 672 752, US 4,945,050, US 15 5,036,006, US 5,100,792, US 5,371,014, US 5,478,744, US 5,179,022, US 5,565,346, US 5,484,956, US 5,508,468, US 5,538,877, US 5,554,798, US 5,489,520, US 5,510,318, US 5,204,253, US 5,405,765, EP 442 174, EP 486 233, EP 486 234, EP 539 563, EP 674 725, WO 91/02071 et WO 95/06128.

La présente invention concerne également les plantes transformées issues de la 20 culture et/ou du croisement des plantes régénérées ci-dessus, ainsi que les graines de plantes transformées.

Les plantes transformées pouvant être obtenues selon l'invention peuvent être du type monocotylédones telles que par exemple les céréales, la canne à sucre, le riz et le maïs ou dicotylédones comme par exemple le tabac, la soja, le colza, le coton, la betterave, le 25 trèfle, etc.

L'invention a aussi pour objet un procédé de désherbage sélectif de plantes, notamment de cultures, à l'aide d'un inhibiteur de l'HPPD notamment un herbicide définit auparavant, caractérisé en ce qu'on applique cet herbicide sur des plantes transformées selon l'invention, tant en présemis, en prélevée qu'en postlevée de la culture.

30 La présente invention concerne également un procédé de contrôle des mauvaises herbes dans une surface d'un champ comprenant des graines ou des plantes transformées avec le gène chimère selon l'invention, lequel procédé consiste à appliquer dans la dite

surface du champ une dose毒ique pour les dites mauvaises herbes d'un herbicide inhibiteur d'HPPD, sans toutefois affecter de manière substantielle les graines ou plantes transformée avec le dit gène chimère selon l'invention.

La présente invention concerne également un procédé de culture des plantes transformées selon l'invention avec un gène chimère selon l'invention lequel procédé consiste à planter les graines des dites plantes transformées dans une surface d'un champ approprié pour la culture des dites plantes, à appliquer sur la dite surface du dit champ une dose毒ique pour les mauvaises herbes d'un herbicide ayant pour cible l'HPPD défini ci-dessus en cas de présence de mauvaises herbes, sans affecter de manière substantielle les dites graines ou les dites plantes transformées, puis à récolter les plantes cultivées lorsqu'elles arrivent à la maturité souhaitée et éventuellement à séparer les graines des plantes récoltées.

Dans les deux procédés ci-dessus, l'application de l'herbicide ayant pour cible l'HPPD peut être faite selon l'invention, tant en présemis, en prélevée qu'en postlevée de la culture.

Par herbicide au sens de la présente invention on entend une matière active herbicide seule ou associée à un additif qui modifie son efficacité comme par exemple un agent augmentant l'activité (synergiste) ou limitant l'activité (en anglais safener). Les herbicides inhibiteurs d'HPPD sont en particulier définis auparavant. Bien entendu, pour leur application pratique, les herbicides ci-dessus sont associée de manière en soi connue aux adjuvants de formulations utilisés habituellement en agrochimie

Lorsque la plante transformée selon l'invention comprend un autre gène de tolérance à un autre herbicide (comme par exemple un gène codant pour une EPSPS chimère ou non conférant à la plante une tolérance au glyphosate), ou lorsque la plante transformée est naturellement insensible à un autre herbicides, le procédé selon l'invention peut comprendre l'application simultanée ou décalée dans le temps d'un inhibiteur d'HPPD en association avec ledit herbicide, par exemple le glyphosate.

L'invention a encore pour objet l'utilisation du gène chimère codant pour une HPPD chimère comme gène marqueur au cours du cycle "transformation-régénération" d'une espèce végétale et sélection sur l'herbicide ci-dessus

Les différents aspects de l'invention seront mieux compris à l'aide des exemples expérimentaux ci-dessous.

Toutes les méthodes ou opérations décrites ci-dessous dans ces exemples sont données à titre d'exemples et correspondent à un choix, effectué parmi les différentes méthodes disponibles pour parvenir au même résultat. Ce choix n'a aucune incidence sur la qualité du résultat et par conséquent, toute méthode adaptée peut être utilisée par l'homme de l'art pour parvenir au même résultat. La plupart des méthodes d'ingénierie des fragments d'ADN sont décrites dans "Current Protocols in Molecular Biology" Volumes 1 et 2, Ausubel F.M. et al , publiés par Greene Publishing Associates et Wiley -Interscience (1989) ou dans Molecular cloning, T.Maniatis, E.F.Fritsch, J.Sambrook,1982.

10 **Exemple 1 : Test de criblage colorimétrique de mutants présentant une tolérance à la 2-cyano-3-cyclopropyl-1-(2-SO₂ CH₃-4-CF₃ phényl) propane-1,3-dione**

pRP C : Le vecteur pRP A (décrit dans la demande WO 96/38567) contenant un fragment d'ADN génomique et la région codante du gène de l'HPPD de *Pseudomonas fluorescens* A32 a été digéré par NcoI, purifié puis ligué dans le vecteur d'expression pKK233-2 (Clontech) lui-même digéré par NcoI, site de clonage unique de ce vecteur. L'orientation du gène dans le vecteur pRP C ainsi obtenu, permettant l'expression sous le contrôle du promoteur *trc* a été vérifiée.

Un milieu de culture de type YT broth à 1% d'agarose (ultra pur Gibco BRL) et à 5mM de L-Tyrosine (Sigma), et contenant l'agent de sélection du vecteur pRP C ci-dessus est dispensé en plaque de 96 puits à raison de 100ul par puits. 10ul d'une culture de E.Coli en phase exponentielle de croissance contenant le vecteur pRP C est dispensée dans chaque puits. Après 16 heures à 37°C, les puits ne contenant que le milieu de culture ou ceux ensemencés avec une culture d'E.Coli contenant le vecteur PKK233-2 sont translucides, alors que les puits ensemencés avec une culture de E.Coli contenant le vecteur pRP C sont de couleur brune.

Une gamme a été réalisée avec milieu de culture identique contenant des concentrations variables (0mM à 14mM) du 2-cyano-3-cyclopropyl-1-(2-méthylsulfonyl-4-trifluorométhylphényl) propan-1,3-dione (EP 0 496 631) solubilisé dans l'eau et amené à pH7,5. Cette molécule est un dicétonitrile, reconnu comme étant un inhibiteur efficace d'activité HPPD (Pallett, K.E. et al 1997. Pestic. Sci. 50, 83-84). On observe une absence totale de coloration pour la culture bactérienne contenant le vecteur pRP C à 7mM du composé ci-dessus.

Des résultats identiques ont été obtenus en substituant, à la 2-cyano-3-cyclopropyl-1-(2-méthyl-4-trifluorométhylphényl)propan-1,3-dione, la 2-cyano-3-cyclopropyl-1-(2-méthylsulfonyl -4-(méthylthio) phényl) propan-1,3-dione, et la 2-(2-chloro-3-ethoxy-4-(éthylsulfonyl) benzoyl)-5-méthyl-1,3-cyclohexadione,(WO 93/03009). Les deux 5 molécules sont en solution dans du DMSO en concentration finale respectivement à 3,5mM et 7mM.

Ces résultats confirment qu'un test basé sur l'activité HPPD quelle que soit l'origine de cette activité, permet d'identifier des activités HPPD présentant une tolérance à des inhibiteurs d'activité HPPD de famille des isoxazoles aussi bien que des tricétones.

10 **Exemple 2: Préparation et évaluation de l'activité d'HPPD chimères**

L'objectif est de faire des fusions entre HPPD d'organismes phylogénétiquement distincts comme les plantes monocotylédones et dicotylédones ou alors comme les plantes les bactéries, ceci ayant plusieurs avantages:

- obtenir des HPPD ayant des caractéristiques en terme d'usage de codons plus favorables pour l'expression dans les hôtes pour lesquelles une tolérance aux inhibiteurs de l'HPPD est souhaitable mais difficile à obtenir avec une HPPD non chimérique,
- obtenir des HPPD ayant des caractéristiques en terme de faible affinité pour les inhibiteurs plus favorables,
- 15 - obtenir une activité HPPD in vitro ou in vivo avec un gène intéressant mais dont on ne dispose que d'un clone partiel.

20 On a testé des fusions de domaines N- et C-terminaux de plantes.

1) Construction

On réalise les fusions entre les régions N-terminales des dicotylédones, et la 25 région C-terminal du maïs. On a permuté ces régions au sein des dicotylédones, proches phylogénétiquement.

La recherche de la zone de fusion s'est appuyée sur des comparaisons de séquences protéiques des différentes HPPD (figure 1). Par homologie avec l'HPPD de *Pseudomonas fluorescens*, on a identifié les parties N-terminales d'*Arabidopsis thaliana* et de *Daucus carota*, elles se terminent respectivement aux tyrosines 219 et 212. Le gène partiel de *Zea mays* correspond donc à 80% de la partie C-terminale de la protéine.

30 On a choisi, comme zone d'échange, la région PINEP, très conservée chez les plantes. Ce qui est avant est la partie N-terminale et ce qui est après est la partie C-terminale. Par l'étude des séquences nucléotidiques, on a cherché à introduire un site de restriction, si possible unique, et qui ne modifie pas ou peu la séquence protéique, dans cette région. Le site de restriction AgeI qui répond à ces critères

peut être obtenu en modifiant l'usage de codons pour les acides aminés E et P adjacents.

Le site AgeI a été introduit par mutagenèse dirigée en utilisant la méthode USE pour les HPPD d'*Arabidopsis thaliana* et de *Daucus carota*, à l'aide des oligonucléotides dégénérés AgeAra, AgeCar et avec l'oligonucléotide de sélection USE AlwNI utilisable avec le vecteur pTRc.

10 AgeAra 5' pCCGATTAACGAACCGGTGCACGGAAC 3'
AgeCar 5' pCCCTTGAATGAACCGGTTATGGGACC 3'
USE AlwNI 5' pCTAATCCTGTTACCGTTGGCTGCTGCC 3'

On a utilisé la mutagenèse par PCR pour introduire, dans le même, temps le site *Sall* en fin de gène et le site *AgeI* chez *Zea māis*, afin de faciliter le sous-clonage de toutes les fusions, dans le même vecteur, aux mêmes sites. Les amorces utilisées sont *AgeMaïs* et *SalMaïsRev*.

AgeMaïs 5' CCGCTAACGAACCGGTGCACGGCACC 3'
SalMaïsRev 5' GCAGTTGCTCGTCGACAAGCTCTGTCC 3'

Après remplacement du fragment AgeI/SalI du clone d'HPPD d'*Arabidopsis thaliana* par le fragment AgeI/SalI de *Zea maïs* ou de *Daucus carota*, on a obtenu les clones codant pour les HPPD chimériques d'*Arabidopsis thaliana* / *Zea maïs* et d'*Arabidopsis thaliana* / *Daucus carota* notés pFAM et pFAC (pour Fusion de N-terminal d'*Arabidopsis thaliana* avec un C-terminal de Maïs ou de Carotte). De la même façon, avec le clone d'HPPD de *Daucus carota*, on a obtenu les clones pFCM et pFCA.

2) Activité in vivo

Le brunissement des colonies isolées, reflet de l'activité de l'HPPD, a été observé pour les fusions FAM, FAC, FCA et FCM. En comparaison avec les HPPD d'origine d'*Arabidopsis thaliana* (FAA) et de *Daucus carota* (FCC), le brunissement a été noté sur une échelle de 1 à 10, 10 représentant le plus fort brunissement (comme décrit dans l'exemple 1)

fragment N-terminal	fragment C-terminal		
	**C	**M	**A
FC*	5	2	2
FA*	9	9	10

Globalement, l'activité baisse pour chaque fusion en comparaison à l'HPPD fournissant le domaine N-terminal complet et début du domaine C-terminal.

Dans le cas où le N-terminal provient d'*Arabidopsis thaliana*, la baisse d'activité est faible mais dans le cas où le N-terminal provient de *Daucus carota*, 5 l'activité mesurée chute plus nettement.

Ces expériences démontrent néanmoins que les HPPD chimères sont des enzymes actives, et qu'il est aujourd'hui tout à fait possible d'exprimer ces chimères dans les plantes, et par exemple d'exprimer une HPPD avec un N-terminal de dicotylédone et un C-terminal de monocotylédone dans les plantes.

REVENDICATIONS

1. HPPD chimère comprenant la partie N-terminale d'une première HPPD associée à la partie C-terminale d'une deuxième HPPD.
5 2. HPPD chimère selon la revendication 1, caractérisée en ce que chaque partie de l'HPPD chimère provient d'une HPPD de toute origine, notamment choisies parmi les HPPD de plantes, de bactéries ou de champignons.
- 10 3. HPPD chimère selon l'une des revendications 1 ou 2, caractérisée en ce que la partie N-terminale de l'HPPD chimère provient d'une HPPD de plante, ladite plante étant préférentiellement choisie parmi les plantes dicotylédones, notamment *Arabidopsis thaliana* ou *Daucus carotta*, ou de monocotylédones comme le maïs ou le blé.
- 15 4. HPPD chimère selon l'une des revendications 1 à 3, caractérisée en ce que la partie C-terminale de l'HPPD chimère provient d'une HPPD de plante ou d'une HPPD de microrganisme.
5. HPPD chimère selon la revendication 4, caractérisée en ce que l'HPPD de plante est choisie parmi les HPPD de plantes dicotylédones, notamment *Arabidopsis thaliana* ou *Daucus carotta*, ou de monocotylédones comme le maïs ou le blé.
- 20 6. HPPD chimère selon la revendication 4, caractérisée en ce que l'HPPD de micro-organisme est une HPPD de bactérie, en particulier *Pseudomonas*, plus particulièrement *Pseudomonas fluorescens*.
7. Séquence d'acide nucléique codant pour une HPPD chimère selon l'une des revendications 1 à 6.
8. Gène chimère comprenant une séquence codante ainsi que des éléments de régulation en position 5' et 3' hétérologues pouvant fonctionner dans un 25 organisme hôte, en particulier les cellules végétales ou les plantes, caractérisé en ce que la séquence codante comprenant au moins une séquence d'acide nucléique codant pour une HPPD chimère selon la revendication 7.
9. Gène chimère selon la revendication 8, caractérisé en ce que l'organisme hôte est choisi parmi les bactéries, par exemple *E. coli*, les levures, en 30 particulier des genres *Saccharomyces* ou *Kluyveromyces*, *Pichia*, les champignons, en particulier *Aspergillus*, les bacilovirus, ou les cellules végétales et les plantes.
10. Gène chimère selon la revendication 8, caractérisé en ce que

REVENDICATIONS

1. HPPD chimère comprenant la partie N-terminale d'une première HPPD associée à la partie C-terminale d'une deuxième HPPD.
- 5 2. HPPD chimère selon la revendication 1, caractérisée en ce que chaque partie de l'HPPD chimère provient d'une HPPD de toute origine, notamment choisies parmi les HPPD de plantes, de bactéries ou de champignons.
- 10 3. HPPD chimère selon l'une des revendications 1 ou 2, caractérisée en ce que la partie N-terminale de l'HPPD chimère provient d'une HPPD de plante, ladite plante étant préférentiellement choisie parmi les plantes dicotylédones, notamment *Arabidopsis thaliana* ou *Daucus carotta*, ou de monocotylédones comme le maïs ou le blé.
4. HPPD chimère selon l'une des revendications 1 à 3, caractérisée en ce que la partie C-terminale de l'HPPD chimère provient d'une HPPD de plante ou d'une HPPD de microrganisme.
- 15 5. HPPD chimère selon la revendication 4, caractérisée en ce que l'HPPD de plante est choisie parmi les HPPD de plantes dicotylédones, notamment *Arabidopsis thaliana* ou *Daucus carotta*, ou de monocotylédones comme le maïs ou le blé.
6. HPPD chimère selon la revendication 4, caractérisée en ce que l'HPPD de micro-organisme est une HPPD de bactérie, en particulier *Pseudomonas*, plus 20 particulièrement *Pseudomonas fluorescens*.
7. Séquence d'acide nucléique codant pour une HPPD chimère selon l'une des revendications 1 à 6.
8. Gène chimère comprenant une séquence codante ainsi que des éléments de régulation en position 5' et 3' hétérologues pouvant fonctionner dans un 25 organisme hôte, en particulier les cellules végétales ou les plantes, caractérisé en ce que la séquence codante comprenant au moins une séquence d'acide nucléique codant pour une HPPD chimère selon la revendication 7.
9. Gène chimère selon la revendication 8, caractérisé en ce que l'organisme hôte est choisi parmi les bactéries, par exemple *E. coli*, les levures, en 30 particulier des genres *Saccharomyces* ou *Kluyveromyces*, *Pichia*, les champignons, en particulier *Aspergillus*, les bacilovirus, ou les cellules végétales et les plantes.
10. Gène chimère selon la revendication 8, caractérisé en ce que

l'organisme hôte est une cellule végétale ou une plante.

11. Gène chimère selon la revendication 10, caractérisé en ce qu'il comprend en 5' de la séquence d'acide nucléique codant pour une HPPD chimère, une séquence d'acide nucléique codant pour un peptide de transit de plante, cette 5 séquence étant disposée entre la région promotrice et la séquence codant pour l'HPPD chimère de manière à permettre l'expression d'une protéine de fusion peptide de transit/HPPD chimère.

12. Protéine de fusion peptide de transit/HPPD chimère, l'HPPD chimère étant définie selon l'une des revendications 1 à 6.

10 13. Vecteur de clonage et/ou d'expression pour la transformation d'un organisme hôte caractérisé en ce qu'il contient au moins un gène chimère selon l'une des revendications 8 à 11.

14. Procédé de transformation d'un organisme hôte, caractérisé en ce que l'on intègre de manière stable dans ledit organisme hôte au moins une séquence 15 d'acide nucléique selon la revendication 7 ou un gène chimère selon l'une des revendications 8 à 11.

15. Procédé selon la revendication 14, caractérisé en ce que l'organisme hôte est une cellule végétale.

16. Procédé selon la revendication 15, caractérisé en ce que l'on régénère 20 une plante à partir de la cellule végétale transformée.

17. Organisme hôte transformé, en particulier cellule végétale ou plante, caractérisé en ce qu'il contient une séquence d'acide nucléique selon la revendication 7 ou un gène chimère selon l'une des revendications 8 à 11.

18. Cellule végétale caractérisé en ce qu'elle contient une séquence 25 d'acide nucléique selon la revendication 7 ou un gène chimère selon l'une des revendications 8 à 11.

19. Plante transformée, caractérisée en ce qu'elle contient des cellules transformées selon la revendication 18.

20. Plante selon la revendication 19, caractérisée en ce qu'elle est 30 régénérée à partir des cellules transformées selon la revendication 18.

21. Plante transformée caractérisée en ce qu'elle est issues de la culture et/ou du croisement des plantes régénérées selon la revendication 20.

22. Plantes transformées selon l'une des revendications 19 à 21, caractérisées en ce qu'elles sont choisies parmi les monocotylédones, notamment les céréales, la canne à sucre, le riz et le maïs, ou les dicotylédones, notamment le tabac, la soja, le colza, le coton, la betterave et le trèfle.

5 23. Graines des plantes transformées selon l'une des revendications 19 à 22.

24. Procédé de contrôle des mauvaises herbes dans une surface d'un champ comprenant des graines selon la revendication 23 ou des plantes transformées selon l'une des revendications 19 à 22, lequel procédé consiste à appliquer dans la 10 dite surface du champ une dose毒ique pour les dites mauvaises herbes d'un herbicide inhibiteur d'HPPD, sans toutefois affecter de manière substantielle les graines ou plantes transformées avec le dit gène chimère selon l'invention.

25. Procédé de culture des plantes transformées selon l'une des revendications 19 à 22, lequel procédé consiste à planter les graines des dites plantes 15 transformées selon la revendication 23 dans une surface d'un champ approprié pour la culture des dites plantes, à appliquer sur la dite surface du dit champ une dose毒ique pour les mauvaises herbes d'un herbicide ayant pour cible l'HPPD en cas de présence de mauvaises herbes, sans affecter de manière substantielle les dites graines ou les dites plantes transformées, puis à récolter les plantes cultivées lorsqu'elles 20 arrivent à la maturité souhaitée et éventuellement à séparer les graines des plantes récoltées.

26. Procédé selon l'une des revendications 24 ou 25, caractérisé en ce que l'inhibiteur d'HPPD est choisi parmi les isoxazoles, en particulier l'isoxaflutole, les dicétonitriles, en particulier la 2-cyano-3-cyclopropyl-1-(2-SO₂ CH₃-4-CF₃ phényl) 25 propane-1,3-dione et la 2-cyano-3-cyclopropyl-1-(2-SO₂ CH₃-4-2,3 Cl₂ phényl) propane-1,3-dione, les tricétones, en particulier la sulcotrione, ou les pyrazolinates.

Mus musculus -----MTTYNN-- KGPKPERG
 Coccidioides immitis -----MAPAADSPTLQ-- PAQPSD--
 Mycosphaerella graminicola -----MAPGALLVTSQNGRITSPLYDSDGYVP-- APAALVVGGE--
 Hordeum vulgare -----MPPTPTTPAA-TGAAAATVPEHARP-- HR-MVRFNPRSDRFHTLSFHH
 Zea mais -----MPPTPTAAAGAAAVAAASAAEQQAAFRILVUGHRNFRFNPRSDRFHTLAFHH
 Arabidopsis thaliana -----MGHQNAAVSE-NQNHDDGAASSPGFCKLVGFSKFVRKNPKSDKFVKRFFH
 Daucus carota -----MGKK-QSEAE-ILSSNSNTSPATFKLVGFNNFVRANPKSDHFAVKRFFH
 Streptomyces avermitilis -----MTQTTTHHT-- PDTARQADP--
 Pseudomonas fluorescens -----MADLYEN-- PMG-- LMGFEF

Numérotation P. fluorescens 1 10

Mus musculus -----VTFWVGNQAKQAAASFYCNKMGFEPIPLAYRCLETGSREVVSHVIKRGKIVFVL
 Coccidioides immitis -----VHWYVGNQAKQAAATYYVTRMGFERVAYRCLETGSKAVASHVVRNGNITFIL
 Mycosphaerella graminicola -----AEWWVGNQAKQVAQFYIITRMGFEPIVAHKGLETGSRFFASHVQNNNGVRFVF
 Hordeum vulgare -----VEFWCADAASAAGRFCAFALGAPLAARSIDLSTGNSAHASQLLRSGSLAFLF
 Zea mais -----VELWCADAASAAGRFSEFGLGAPLAARSIDLSTGNSAHASLLRSGSLSFLF
 Arabidopsis thaliana -----IEFWCGDATNVARRFSWGLGMRFSAKSDLSTGNMVAHSYLLTSGDLRFLF
 Daucus carota -----IEFWCGDATNTSRRFSWGLGMPLVAKSDLSTGNVSVAHSYLVRSANLSEVF
 Streptomyces avermitilis -----VVFAVGNQAA-HYSTAFTGMQLVAYSGPENGSRETASYVLTNGSARFVL
 Pseudomonas fluorescens -----IELASPTPTNTLEPIFEIMGFTKVATHR-- SKD-- VHLYRQGAINLIL

Numérotation P. fluorescens 20 30 40 50

Mus musculus -----CSALN-----PWN-----KEMGDHLLVKHGDCVKDIAFEVEEDC
 Coccidioides immitis -----TSPLR-SVEQA-- SRFP-- EDEALLKEIHAHLERHGDGCKDVAFEVDCV
 Mycosphaerella graminicola -----TSPVRSARQT-- LKAAPLADQARLDEMIDHLKHDGCKDVAFEVDDV
 Hordeum vulgare -----TAPYANGDAA-- TANLPSFSAAAARRFAADHGLAVRAVALRVADA
 Zea mais -----TAPYSPSLSAQEIKPTTASIPSFDHGGSRSFFSSHGLGVRAVIALEVEDA
 Arabidopsis thaliana -----TAPYSPSPSTTSSGS-- AAIPSFSASGFHSFAAKHGLAVRAIALEVEDA
 Daucus carota -----TSVIR--P--A--TPWG-- HFLADHVAEHGDGVVDLIAIEVPDA
 Streptomyces avermitilis -----NNEPH-----S-----VASYFAAEHGGPSVCGMAFRVKDS

Numérotation P. fluorescens 60

70

80

FIG 1

Mus musculus
Coccidioides immitis
Mycosphaerella graminicola
Hordeum vulgare
Zea mays
Arabidopsis thaliana
Daucus carota
Streptomyces avermitilis
Pseudomonas fluorescens

Numérotation P fluorescens ! ! ! ! ! 90 100 110 120 130

Mus musculus G---RFLPGFEAPTYKDTLLPKLPRCNLEIIDHIVGNQPDQEMQSASEWY
Coccidioides immitis G---GFMPGYRMEASNADATSKFLPKVVLERIDHCVGNDWDEMERCDDY
Mycosphaerella graminicola G---PFLPGYRSCTTVDSANKFLPPVNLEAIDHCVGNDWDEMDSACDFY
Hordeum vulgare D---VPFLPGFEGVTNPDAVD---YGLTRFDDHIVGNVP---YGLSREFDHI
Zea mays AG-EPFLPGFEGVASPGAAD---YGLSREFDHI
Arabidopsis thaliana TEKSEFLPGFERVEDASSFP-LD---YGIRRLLDHAVGNVP---ELGPALTYV
Daucus carota G---LFLPGFEAVEGTTASFPDLD---YGIRRLLDHAVGNVT---ELGPVVEYI
Streptomyces avermitilis G---PYLPGYVAA---PIVEPPAHTFQAIDHCVGNNVELGRMNEWVGFY
Pseudomonas fluorescens S---SIYDIDFVFLEGVDRHP-VG---AGLKIIDHLTHNVYRGRMAYWANFY

Numérotation *P. fluorescens* : 140 150 160 170

Imméritation P fluorescence 180 190 200 210 220 :

סימן 1 (units)

FIG. 1 (continued)

Mus musculus
Coccidioides immitis
Mycosphaerella graminicola
Hordeum vulgare
Zea mais
Arabidopsis thaliana
Daucus carota
Streptomyces avermitillii
Pseudomonas fluorescens
:
!

Numérotation P. fluorescens

350

FIG 1 (fin)

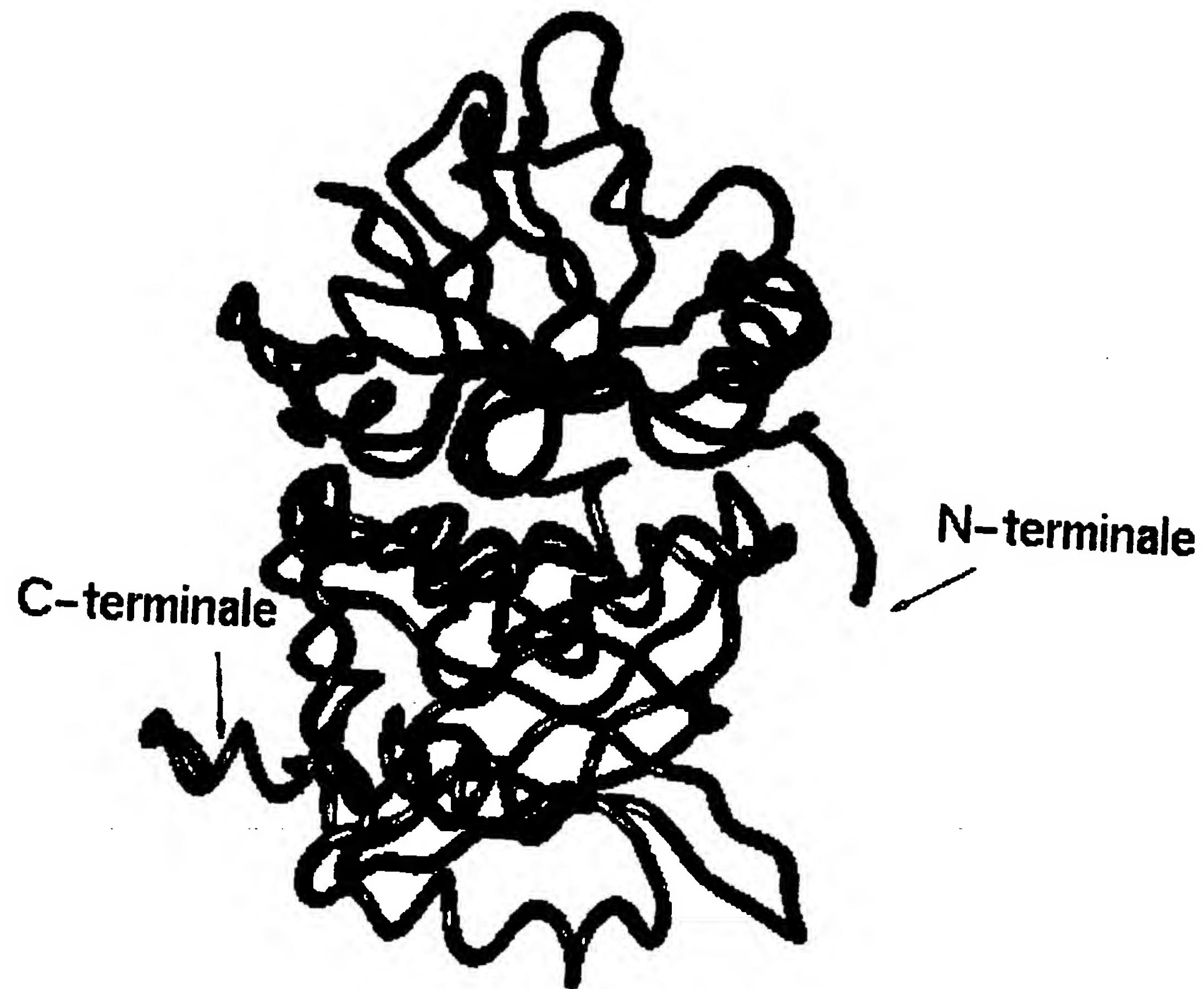


FIG 2

LISTE DE SEQUENCES

(1) INFORMATIONS GENERALES:

(i) DEPOSANT:

- (A) NOM: RHONE-POULENC AGROCHIMIE
- (B) RUE: 14-20 Rue Pierre BAIZET
- (C) VILLE: LYON
- (E) PAYS: France
- (F) CODE POSTAL: 69009

(ii) TITRE DE L'INVENTION: Hydroxy-phényl pyruvate dioxygénase chimère, séquence d'ADN et obtention de plantes contenant un tel gène, tolérantes aux herbicides

(iii) NOMBRE DE SEQUENCES: 5

(iv) FORME DECHIFFRABLE PAR ORDINATEUR:

- (A) TYPE DE SUPPORT: Floppy disk
- (B) ORDINATEUR: IBM PC compatible
- (C) SYSTEME D'EXPLOITATION: PC-DOS/MS-DOS
- (D) LOGICIEL: PatentIn Release #1.0, Version #1.30 (OEB)

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 1:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 26 paires de bases
- (B) TYPE: nucléotide
- (C) NOMBRE DE BRINS: simple
- (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADN

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 1:

CCGATTAACG AACCGGTGCA CGGAAC

26

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 2:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 27 paires de bases
- (B) TYPE: nucléotide
- (C) NOMBRE DE BRINS: simple
- (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADN

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 2:

CCCTTGAATG AACCGGTGTA TGGGACC

27

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 3:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 27 paires de bases
- (B) TYPE: nucléotide
- (C) NOMBRE DE BRINS: simple
- (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADN

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 3:

CTAATCCTGT TACCGTTGGC TGCTGCC

27

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 4:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 27 paires de bases
- (B) TYPE: nucléotide
- (C) NOMBRE DE BRINS: simple
- (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADN

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 4:

CCGCTAACG AACCGGTGCA CGGCACC

27

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 5:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 27 paires de bases
- (B) TYPE: nucléotide
- (C) NOMBRE DE BRINS: simple
- (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADN

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 5:

GCAGTTGCTC GTCGACAAGC TCTGTCC

27

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 6 C12N15/53 C12N15/62 C12N15/82 C12N5/10 C12N9/02
A01H5/00 A01H5/10

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 6 C12N C12Q A01H

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 96 32484 A (ARCH DEV CORP) 17 October 1996 see the whole document, especially page 12 1.9-14 ---	1-26
A	LEE M. ET AL.: "The C-terminal of rat 4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase is indispensable for enzyme activity" FEBS LETTERS, vol. 393, no. 2, 3, 16 September 1996, pages 269-272, XP002070559 see the whole document, especially page 270 right hand column, paragraph 2 ---	1-26 -/-



Further documents are listed in the continuation of box C.



Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents :

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

30 March 1999

Date of mailing of the international search report

09/04/1999

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl.
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Kania, T

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 96 38567 A (RHONE POULENC AGROCHIMIE ; SAILLAND ALAIN (FR); ROLLAND ANNE (FR);) 5 December 1996 cited in the application see the whole document ---	1-26
A	WO 97 27285 A (UNIV ARIZONA) 31 July 1997 see the whole document ---	1-44
A	GARCIA I. ET AL.: "Subcellular localization and purification of a p-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase from cultured carrot cells and characterization of the corresponding cDNA" BIOCHEMICAL JOURNAL, (1997 AUG 1) 325 (PT 3) 761-9. JOURNAL CODE: 9Y0. ISSN: 0264-6021., XP002070560 see the whole document ---	1-44
A	EP 0 252 666 A (NOVO INDUSTRI AS) 13 January 1988 see the whole document -----	1-26

Information on patent family members

PCT/FR 98/02391

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)		Publication date
WO 9632484	A 17-10-1996	AU 5543296	A 30-10-1996	CA 2218139 A 17-10-1996
		EP 0820514	A 28-01-1998	US 5801233 A 01-09-1998
WO 9638567	A 05-12-1996	FR 2734840	A 06-12-1996	FR 2734841 A 06-12-1996
		FR 2734842	A 06-12-1996	AU 6228696 A 18-12-1996
		BG 102131	A 31-07-1998	BR 9608375 A 05-01-1999
		CA 2219979	A 05-12-1996	CA 2219979 A 05-12-1996
		CN 1192243	A 02-09-1998	CZ 9703809 A 18-03-1998
		EP 0828837	A 18-03-1996	EP 0828837 A 18-03-1996
		HR 960245	A 31-08-1997	PL 323679 A 14-04-1998
		SK 161597	A 08-07-1998	SK 161597 A 08-07-1998
WO 9727285	A 31-07-1997	AU 1845397	A 20-08-1997	EP 0877793 A 18-11-1998
EP 0252666	A 13-01-1988	AT 90965	T 15-07-1993	DE 3786306 A 29-07-1993
		DE 3786306	T 13-01-1994	DE 3786306 T 13-01-1994
		DK 336887	A, B, 31-12-1987	DK 336887 A, B, 31-12-1987
		ES 2056821	T 16-10-1994	ES 2056821 T 16-10-1994
		JP 2582787	B 19-02-1997	JP 2582787 B 19-02-1997
		JP 63068084	A 26-03-1988	JP 63068084 A 26-03-1988
		US 5234823	A 10-08-1993	US 5234823 A 10-08-1993

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE	C12N15/53	C12N15/62	C12N15/82	C12N5/10	C12N9/02
CIB 6	A01H5/00	A01H5/10			

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)

CIB 6 C12N C12Q A01H

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si réalisable, termes de recherche utilisés)

C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie *	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	WO 96 32484 A (ARCH DEV CORP) 17 octobre 1996 voir le document en entier, préf. p.12 1.9-14 ---	1-26
A	LEE M. ET AL.: "The C-terminal of rat 4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase is indispensable for enzyme activity" FEBS LETTERS, vol. 393, no. 2, 3, 16 septembre 1996, pages 269-272, XP002070559 voir le document en entier, préf. p. 270 col. droite 2. par. ---	1-26 -/-

Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents

Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

* Catégories spéciales de documents cités:

- "A" document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent
- "E" document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date
- "L" document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)
- "O" document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens
- "P" document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

- "T" document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention
- "X" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément
- "Y" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier
- "&" document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

30 mars 1999

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

09/04/1999

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale

Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl.
Fax: (+31-70) 340-3016

Fonctionnaire autorisé

Kania, T

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie	Identification des documents cités, avec le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	WO 96 38567 A (RHONE POULENC AGROCHIMIE ; SAILLAND ALAIN (FR); ROLLAND ANNE (FR);) 5 décembre 1996 cité dans la demande voir le document en entier ---	1-26
A	WO 97 27285 A (UNIV ARIZONA) 31 juillet 1997 voir le document en entier ---	1-44
A	GARCIA I. ET AL.: "Subcellular localization and purification of a p-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase from cultured carrot cells and characterization of the corresponding cDNA" BIOCHEMICAL JOURNAL, (1997 AUG 1) 325 (PT 3) 761-9. JOURNAL CODE: 9Y0. ISSN: 0264-6021., XP002070560 voir le document en entier ---	1-44
A	EP 0 252 666 A (NOVO INDUSTRI AS) 13 janvier 1988 voir le document en entier -----	1-26

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

PCT/FR 98/02391

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)		Date de publication
WO 9632484 A	17-10-1996	AU	5543296 A	30-10-1996
		CA	2218139 A	17-10-1996
		EP	0820514 A	28-01-1998
		US	5801233 A	01-09-1998
WO 9638567 A	05-12-1996	FR	2734840 A	06-12-1996
		FR	2734841 A	06-12-1996
		FR	2734842 A	06-12-1996
		AU	6228696 A	18-12-1996
		BG	102131 A	31-07-1998
		BR	9608375 A	05-01-1999
		CA	2219979 A	05-12-1996
		CN	1192243 A	02-09-1998
		CZ	9703809 A	18-03-1998
		EP	0828837 A	18-03-1996
		HR	960245 A	31-08-1997
		PL	323679 A	14-04-1998
		SK	161597 A	08-07-1998
WO 9727285 A	31-07-1997	AU	1845397 A	20-08-1997
		EP	0877793 A	18-11-1998
EP 0252666 A	13-01-1988	AT	90965 T	15-07-1993
		DE	3786306 A	29-07-1993
		DE	3786306 T	13-01-1994
		DK	336887 A, B,	31-12-1987
		ES	2056821 T	16-10-1994
		JP	2582787 B	19-02-1997
		JP	63068084 A	26-03-1988
		US	5234823 A	10-08-1993